

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit,
Hemmbarkeit und Reaktivierbarkeit von
Angiotensin-II-amid spaltenden Aminopeptidasen
in menschlichen Erythrozyten**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Güven Kantarcioglu
aus Ankara

Mainz 1975
—

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der
Johannes Gutenberg-Universität M a i n z

Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit, Hemmbarkeit und
Reaktivierbarkeit von Angiotensin-II-amid spaltenden Amino-
peptidasen in menschlichen Erythrozyten

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, den Medizinischen
Fachbereichen

vorgelegt von
Güven KANTARCIOGLU
aus Ankara

Mainz, 1975

Fachbereichsdekan: Prof. Dr. E. STRAUB

Referent : Prof. Dr. A. DISTLER

Korreferent : Prof. Dr. D. LOMMER



Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit, Hemmbarkeit und Reaktivierbarkeit von Angiotensin-II-amid spaltenden Aminopeptidasen in menschlichen Erythrozyten

Verschiedene Autoren haben eine Abhängigkeit der pressorischen Wirkung von Asparaginy¹-Angiotensin II von der Höhe der Plasmarenin- (1,2,3) bzw. der Plasmaangiotensinkonzentration (1) beobachtet. Bei hoher Plasmarenin- bzw. Angiotensinkonzentration erwies sich die pressorische Wirkung von Asparaginy¹-Angiotensin II als abgeschwächt, bei niedriger Konzentration dagegen als gesteigert. Dieser Befund könnte durch eine Konkurrenz zwischen Asparaginy¹-Angiotensin II (vgl.4) um denselben Rezeptor erklärt werden. Andererseits ist jedoch vorstellbar, daß der Aktivitätszustand der für den Abbau von Asparaginy¹-Angiotensin II verantwortlichen Enzyme den Grad der pressorischen Wirkung dieses Oktapeptids bestimmen.

In dieser Arbeit wurde versucht, die am Abbau von Asparaginy¹-Angiotensin II beteiligten Enzyme näher zu charakterisieren. Da der Angiotensinabbau in den Organen beim Menschen nicht oder nur sehr schwer einer Untersuchung zugänglich ist, haben wir als Modell den Erythrozyten gewählt. Der "Angiotensinase"-Gehalt der Erythrozyten ist höher als der des Plasmas (5,6,7,8,9), wobei für den Angiotensinabbau im Hämolysat vorwiegend Aminopeptidasen verantwortlich sein sollen. Die besondere Bedeutung der Aminopeptidasen für den Abbau des Angiotensinmoleküls an der N-terminalen Peptidbindung wird durch Befunde von Regoli und Park (10) hervorgehoben, wonach Phenylalanin in Position 8 für die Stimulierung des Rezeptors von Angiotensin II essentiell ist und die Bindung an den Rezeptor von Histidin in Position 6 und Tyrosin in Position 4 abhängig ist.

In dieser Arbeit berichten wir zunächst über die mit Hilfe eines NADH-abhängigen optischen Tests bestimmbare Aminopeptidaseaktivität des Hämolylysats nach Abtrennung der Erythrozytenmembranen, wobei die Freisetzung vom N-terminalen Ende des Angiotensinmoleküls bestimmt wurde. Geprüft wurde die Inaktivierbarkeit der Aminopeptidasen durch den Chelatbildner Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) und ihre Beeinflußbarkeit durch zweiwertige Metallionen in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. Weiterhin untersuchten wir die Wirkung verschiedener Effektoren auf die Hydrolyse von α -L-Asparaginy¹-Angiotensin II und die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur.

Material und Methoden

Reagentien

DEAE-Cellulose (Kapazität 0,73 mEq/g) SERVA, Heidelberg;
 β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NADH), Glutamat-Oxalat-Transaminase (GOT), Malat-Dehydrogenase (MDH), alpha-Ketoglutar säure BOEHRINGER MANNHEIM GmbH;
Asparaginase CRASNITIN BAYER LEVERKUSEN;
Angiotensin-II-amid HYPERTENSIN CIBA, Basel;
p-Chloromercuribenzoessäure Natrium salt (PCMB),
Diisopropylfluorophosphat (DFP) SERVA, Heidelberg;
Aethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Dinatrium salt MERCK, Darmstadt.

Präparation des Hämolyats

Peripheres venöses Blut von gesunden Versuchspersonen wurde in vorgekühlte Flaschen entnommen, die unmittelbar nach Blutentnahme in Eis gestellt und bei 1900 g 20 min lang in 4 ° C zentrifugiert wurden. Die Aufarbeitung der Erythrozyten ist in Abb.1 schematisch dargestellt.

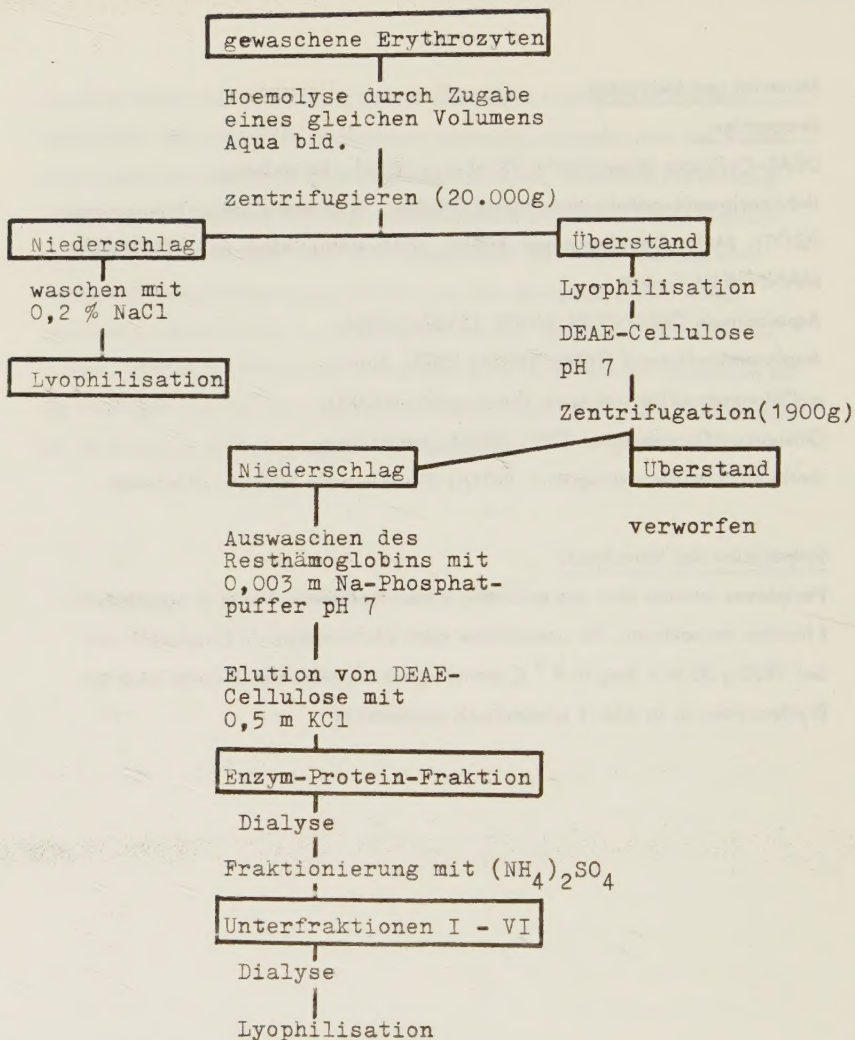


Abb. 1

Nach Absaugen des Plasmas und des "buffy coat" (Thrombozyten, Leukozyten, Lipide) wurden die Erythrozyten dreimal in 0,9%iger physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, die Zellen dann in 1 Vol. Aq.bidest. hämolyisiert. Das Hämolysat wurde dann bei 20.000 g 10 min lang zentrifugiert, der dunkle transparente Überstand dekantiert und lyophilisiert.

Präparation der Erythrozytenmembranen

Danach wurde das im Niederschlag befindliche trübe Sediment so lange (ca. zehnmal) mit 0,2%iger NaCl gewaschen bis fast alles Hämoglobin entfernt war. Anschließend wurden die Membranen lyophilisiert.

Präparation der DEAE-Cellulose (EPF)

Die hämoglobinfreie Proteinfraction, d.h. die Enzym-Protein-Fraktion wurde nach der Vorschrift von Hennessey et al.(5) mit DEAE-Cellulose gewonnen.

8 g lyophilisiertes Hämolysat wurde in 40 ml 0,03 m Na-Phosphatpuffer pH 9,1 gelöst und zu gleichen Teilen à 5 ml auf 50 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt. Die folgende Prozedur beschreibt die Behandlung einer 5-ml-Probe. Alle Schritte wurden bei 4 ° C ausgeführt.

Zu 5 ml Hämolysat wurden 10 ml DEAE-Cellulose-Suspension zugefügt und die Mischung bei 4 ° C 20 min regelmäßig gerührt. Das nicht adsorbierte Hämoglobin im Überstand wurde durch 15minütiges Zentrifugieren bei 1900 g entfernt, und das Resthämoglobin durch mehrmaliges Waschen des Adsorbens mit 0,03 m Phosphatpuffer pH 7,0 beseitigt. Die Enzym-Protein-Fraktion schließlich wurde von der DEAE-Cellulose durch 10 ml 0,5m KCl eluiert, indem die Mischung 1 h im Eisbad gerührt wurde. Es wurde 15 min bei 1900 g zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Diese Extraktion wurde noch dreimal wiederholt. Die Entsalzung erfolgte schließlich durch eine 48stündige Dia-

lyse gegen 0,9%ige Kochsalzlösung unter dreimaligem Wechsel des Dialysewassers. 20 ml Erythrozytenkonzentrat entsprachen 3185 mg Totalprotein, von dem 3040 mg auf das Hämoglobin und 145 mg auf die Enzym-Protein-Fraktion entfielen (11).

Messung der Asparagin-Abspaltung aus α -L-Asparaginy¹-Angiotensin II (Aminopeptidaseaktivität) nach Oelkers und v. Goldacker (12)

Die Enzymaktivitätsbestimmung erfolgte mit Hilfe des NADH-abhängigen optischen Tests mit α -L-Asparaginy¹-Angiotensin II als Substrat, wobei als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der enzymatischen Inaktivierung von Asparaginy¹-Angiotensin II die Hydrolyse der N-terminalen Peptidbindung gemessen wurde.

I. 30 mg Protein wurden in 0,5 ml Substratlösung (5 mg Hypertensin Ciba ad 2 ml 0,067 m Na-Phosphatpuffer, pH 6,4) 60 min lang bei 37 ° C im Wasserbad inkubiert (Substratkonzentration ist $1,8 \times 10^{-3}$ m). Zur Fällung der Proteine wurden 0,2 ml 5N HClO₄ zugegeben. Das Inkubationsgemisch wurde 20 min bei 3000 g/min zentrifugiert und das Präzipitat verworfen. Der Überstand wurde mit 5N KOH neutralisiert.

II. 1,5 ml dieser Lösung wurden mit 0,2 ml Na-Phosphatpuffer (0,67m) pH 7,2 und 0,20 ml Asparaginase (Crasnitin) inkubiert. Unter Modifizierung der von Oelkers und v. Goldacker (12) angegebenen Methode wurde die käufliche Asparaginase (Crasnitin) dem Inkubationsgemisch zugesetzt. Das vom Angiotensin-II-amid abgespaltene Asparagin wurde dadurch auf enzymatischem Wege in Asparaginsäure umgewandelt, die dann ihrerseits quantitativ in einem NADH-abhängigen optischen Test bestimmt werden konnte.

III. Optischer Test. Die fotometrische Messung erfolgte am Fotometer "Eppendorf" bei 366 nm in 1-cm-Küvetten bei Zimmertemperatur. In die Küvette wurden nacheinander pipettiert:

1,86 ml 0,067m Na-Phosphatpuffer pH 7,2;

0,02 ml GOT (2,5 mg Protein/ml in 1,6m $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$);

0,02 ml MDH (2,5 mg Protein/ml in 2,8m $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$);

0,5 ml einer einprozentigen NADH-Lösung;

1,0 ml Inkubationsgemisch von Schritt II.

Der Küvetteninhalt wurde gut gemischt und die Extinktion gegen Wasser gemessen.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,04 ml einer 0,1m Na-alpha-Ketoglutarat-Lösung in Aqua bidest. gestartet. Nach 10 min wurde die Extinktion abgelesen.

Aminopeptidase

α -L-Asp(NH_2)-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe(COOH)

α -L-Asp(NH_2)+Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe(COOH)

α -L-Asp(NH_2) $\xrightarrow[\text{(Crasnitin)}]{\text{Asparaginase}}$ L-Asparaginsäure + NH_3

α -L-Asparaginsäure + GOT $\xrightarrow{\quad}$ Oxalessigsäure +

α -Ketoglutaratsäure $\xrightarrow{\quad}$ α -L-Glutaminsäure

Oxalessigsäure + MDH $\xrightarrow{\quad}$ Äpfelsäure +

DPN + H^+ + DPN

α -L-Asp(NH_2) = Asparagin. GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase.

MDH = Malat-Dehydrogenase.

Zur Überprüfung auf Reproduzierbarkeit der Methodik wurden bei 4 gesunden Personen 8 Mehrfachbestimmungen durchgeführt, nachdem jeder Person zu verschiedenen Zeiten achtmal Blut entnommen wurde. Mit Hilfe einer zweifachen Varianzanalyse konnte für die Bestimmung der Amino-peptidaseaktivität im Hämolysat ein Methodenfehler von 4,10 %, in den Membranen von 2,52 %, bezogen auf die beobachtete Personenvarianz, berechnet werden (Tab.1)

Fraktionierung der Enzym-Protein-Fraktion mit Ammoniumsulfat

Die Ammoniumsulfatfällung wurde in den Konzentrationen von 0,39m (Fraktion I); 1,76m (Fraktion II); 2,35m (Fraktion III); 2,95m (Fraktion IV); 4,03m (Fraktion V) durchgeführt. Der verbleibende Überstand entspricht der Fraktion VI. Die Niederschläge wurden jeweils in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und 48 h gegen das 100fache Volumen einer physiologischen Kochsalzlösung unter dreimaligem Wechsel des Dialysewassers bei 4 ° C dialysiert. Die Fraktion VI wurde direkt dialysiert und lyophilisiert.

Die Wirkung verschiedener Effektoren auf die Hydrolyse von alpha-L-AsparaginyI-Angiotensin II

Das Hämolysat, die Enzym-Protein-Fraktion (EPF) sowie die Unterfraktionen wurden bei pH 5; 7 und 8 (0,067m Na Phosphatpuffer) mit 10^{-3} m $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ bei 25 ° C 1 h präinkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Substrat gestartet. Zur Untersuchung der Reaktivierbarkeit durch Ca^{++} wurde dem durch $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ präinkubierten Ansatz Ca^{++} in einer Konzentration von 10^{-3} m zugesetzt und ebenfalls nach Substratzugabe die enzymatische Aktivität gemessen.

p-Chloromercuribenzoat (PCMB) und Diisopropylfluorphosphat (DFP) in der Konzentration von 10^{-3} m wurden für die Inhibitionsstudie verwandt und der Inkubationslösung direkt zugesetzt.

Statistik

1. Zur Überprüfung auf Zuverlässigkeit der Aktivitätsbestimmung wurde eine zweifache Varianzanalyse sowie der Intraclasskorrelationskoeffizient (13) berechnet.
2. Zur Prüfung auf Beeinflußbarkeit der Amino-peptidaseaktivität durch Ca^{++} und Na_2EDTA in Abhängigkeit vom pH wurde eine dreifache Varianzanalyse mit Wiederholungen durchgeführt. Die mittleren Abweichungsquadrate wurden nach Brownlee (14) an dem mittleren Abweichungsquadrat getestet.
3. Zum Nachweis der Beeinflußbarkeit der Enzymaktivität durch DFP und PCMB wurde jeweils eine zweifache Varianzanalyse mit Wiederholungen berechnet (14).

Als statistisch signifikant wurde ein Ergebnis bezeichnet, bei dem die zu der entsprechenden Testgröße gehörende Irrtumswahrscheinlichkeit höchstens 0,01 betrug. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit, die mehr als 0,01, aber höchstens 0,05 betrug, wurde das Ergebnis als statistisch auffällig bezeichnet. Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit größer als 0,05 gelten als nicht signifikant.

Ergebnisse

1. Aminopeptidaseaktivität im Hämolsat und in den Erythrozytenmembranen bei pH 6,4:

Bei Aufarbeitung des Hämolsats nach Hennessey et al. (11) fanden wir bei einer Gesamtausbeute an Aminopeptidasen von $89,78 \pm 9,61$ % ($n = 5$), daß $5,15 \pm 2,34$ % ($n = 5$) von der DEAE-Cellulose nicht adsorbiert wurden, $5,06 \pm 1,88$ % ($n = 5$) nach der Bindung an den Ionenaustauscher nicht mehr eluiert werden konnten.

Mit Asparaginyll¹-Angiotensin II als Substrat ließ sich sowohl im Hämolsat menschlicher Erythrozyten als auch in der Enzym-Protein-Fraktion der Erythrozyten und deren Unterfraktionen sowie in den Erythrozytenmembranen eine Aminopeptidaseaktivität nachweisen. Die Aminopeptidaseaktivitäten des Hämolsats und der Erythrozytenmembranen sowie der Enzym-Protein-Fraktion unterschieden sich nicht signifikant. Ebenso ergaben die Aktivitätsbestimmungen der mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gefällten Unterfraktionen der Enzym-Protein-Fraktion keine signifikanten Unterschiede (Tab.I).

2. Beeinflußbarkeit der Aminopeptidaseaktivität durch Calcium-Ionen und Na_2 -EDTA in Abhängigkeit vom pH-Wert (Tab.II):

a) Hämolsat und Enzym-Protein-Fraktion (EPF):

Sowohl das membranfreie Hämolsat als auch die Enzym-Protein-Fraktion zeigten bei pH 5 nach Zugabe der Effektoren keinen Aktivitätsverlust. Während die Aminopeptidaseaktivität des Hämolsats bei pH 7 unter Na_2 -EDTA nur bis auf 73,4 % gehemmt wurde, fiel die Enzymaktivität der Enzym-Protein-Fraktion auf 13,8 %. Unter dem Einfluß von Ca^{++} kam es nur in der Enzym-Protein-Fraktion zu einer partiellen Reaktivierung, während die Enzymaktivität des Hämolsats weiter vermindert wurde.

Bei pH 8 wurde die Aktivität des Hämolsats durch Na_2 -EDTA am stärksten gehemmt, Ca^{++} führte zu keiner Reaktivierung. Die Enzymaktivität der EPF

wurde nach Hemmung durch $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ bis auf 27,0 % durch Ca^{++} ebenfalls nicht reaktiviert.

b) Durch Ammoniumsulfatfällung gewonnene Unterfraktionen (Tab.II):

Durch die Ammoniumsulfatfällung und die unterschiedliche Beeinflußbarkeit der Fraktionen I - VI durch $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ und Ca^{++} ließ sich bei den gemessenen pH-Werten eine unterschiedliche Anzahl von Aminopeptidasen nachweisen, die Asparaginy¹-Angiotensin II inaktivieren. Nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung wurden nur die benachbarten Fraktionen verglichen, da angenommen werden mußte, daß ein in einer Fraktion nicht vollständig ausgefälltes Enzym bei Steigerung der Ammoniumsulfatkonzentration beim nächsten Fraktionierungsschritt quantitativ ausgesalzt wurde. Bei pH 5 waren 5 Enzyme nachweisbar. In Fraktion I und II fiel nach $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Zugabe die Ausgangsaktivität auf 57,8 % bzw. 55,7 % ab ($p < 0,01$). Während es in Fraktion I nach Recalcifizierung zu keiner signifikanten Aktivitätsminderung kam (1.Enzym), war bei Fraktion II unter Ca^{++} -Zusatz eine signifikante Hemmung der enzymatischen Aktivität zu beobachten ($p \leq 0,01$)(2.Enzym). Bei Vergleich der zweiten mit der dritten Fraktion ergaben sich nach Zugabe von $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ und anschließender Recalcifizierung statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,01$)(3.Enzym). Der Nachweis dieses dritten Enzyms wurde weiterhin dadurch untermauert, daß in Fraktion II nach Recalcifizierung die Aminopeptidaseaktivität im Gegensatz zu Fraktion III statistisch signifikant abnahm ($p < 0,01$). Die enzymatischen Aktivitäten der Fraktion III und IV unterschieden sich sowohl unter $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ als auch nach Recalcifizierung signifikant ($p \leq 0,01$ bzw. $< 0,05$)(4.Enzym).

Fraktion IV und V zeigten keine signifikanten Unterschiede unter $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ und nach Recalcifizierung. Ein weiteres Enzym ließ sich in Fraktion VI charakterisieren, da sich sowohl nach $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Zusatz ($p < 0,01$) als auch nach Recalcifizierung ($p < 0,01$) die Enzymaktivitäten der Fraktion VI von

der Fraktion V signifikant unterschieden (5.Enzym).

Fünf verschiedene Amino-peptidasen konnten bei pH 7 abgegrenzt werden. Während sich in Fraktion I und II nach Recalcifizierung des durch $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ gehemmten Enzyms die Aktivitäten nicht signifikant änderten, war in Fraktion III nach Recalcifizierung keine Aktivität mehr zu finden. Hieraus läßt sich schließen, daß in Fraktion I (1.Enzym) und in Fraktion III (2.Enzym) unterschiedliche Enzyme vorlagen, während sich in Fraktion II bei diesem pH-Wert das Enzym nicht von dem der Fraktion I unterscheiden ließ. Die Ca^{++} -Zugabe führte in dem durch $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ gehemmten Enzym der Fraktion IV im Gegensatz zu dem der Fraktion III ($p \leq 0,01$) zu keiner Aktivitätsänderung (3.Enzym). Eine weitere Amino-peptidase war in Fraktion V nachweisbar, da sich auch hier auffällige Unterschiede nach Recalcifizierung gegenüber der Fraktion IV zeigen ließen ($p \leq 0,05$) (4.Enzym). In Fraktion VI war nach Ca^{++} -Zusatz keine Amino-peptidaseaktivität mehr nachzuweisen, wodurch sich diese Fraktion signifikant ($p \leq 0,01$) von der Fraktion V unterschied (5.Enzym).

Bei pH 8 ließen sich vier unterschiedliche Amino-peptidasen charakterisieren. Wie bei pH 7 ergab sich in Fraktion I und II kein Hinweis auf das Vorliegen verschiedener Enzyme (1.Enzym). Die Enzymaktivität der Fraktion III wurde durch $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Zusatz vollständig gehemmt und durch Ca^{++} nicht mehr reaktiviert, wodurch sie sich signifikant ($p \leq 0,01$) von der Fraktion II unterschied (2.Enzym). In den Fraktionen IV und V führte die Recalcifizierung nach einer signifikanten Hemmung durch $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ zu einer vollständigen Reaktivierung. Signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Fraktionen waren nicht nachweisbar, jedoch bestand eine signifikante Abweichung gegenüber dem Enzym der Fraktion III ($p \leq 0,01$) (3.Enzym). Die Differenzierung eines vierten Enzymes wurde dadurch ermöglicht, daß sich in Fraktion VI nach $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Zusatz ein auffälliger Unterschied gegenüber dem Enzym der Fraktion V nach-

weisen ließ ($p < 0,05$), während nach einer Recalcifizierung in beiden Fraktionen eine vollständige Reaktivierung erfolgte.

Zusammenfassend ergab sich der sichere Nachweis von sechs Enzymen aus der unterschiedlichen Beeinflussbarkeit der Fraktionen der EPF durch $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ und Ca^{++} bei verschiedenen pH-Werten. Bei jeder der gewählten Wasserstoffionenkonzentration war in Fraktion I die erste Aminopeptidase nachweisbar, eine zweite fand sich eindeutig in Fraktion II nur bei pH 5, während bei pH 7 und 8 die Enzyme beider Fraktionen gleichermaßen durch $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ und Ca^{++} beeinflussbar waren. In Fraktion III und IV war bei allen gemessenen pH-Werten ein drittes und viertes Enzym nachweisbar, das sich von den Aminopeptidaseaktivitäten der vorhergehenden Fraktionen unterschied. Die Abgrenzung einer fünften Aminopeptidase war in Fraktion V nur bei pH 7 möglich. In Fraktion VI ließ sich bei allen pH-Werten eine sechste Aminopeptidase von dem Enzym der Fraktion V abgrenzen.

3. Der Einfluß von PCMB und DFP auf die Aminopeptidaseaktivität des Hämolyats (Tab.III):

a) DFP: Diisopropylfluorophosphyt (10^{-3} mol/l) führte bei verschiedenen pH-Werten zu einer Hemmung der Enzymaktivität; bei pH 5 war noch eine Restaktivität von $68,7 \pm 1,5$ %, bei pH 6,5 von $51,3 \pm 2,4$ %, bei pH 7 von $59,6 \pm 5,8$ % und bei pH 8 von $55,2 \pm 3,8$ % nachweisbar.

b) PCMB: Der Sulfhydrylgruppeninhibitor p-Chloromercuribenzoat (10^{-3} mol/l) hemmte die Aminopeptidasen bei pH 6,5 auf $33,9 \pm 0,8$ %, bei pH 7 und 8 bis auf $18,0 \pm 1,1$ % bzw. $18,1 \pm 2,7$ % ihrer Aktivität. Die Unterschiede vor und nach Zugabe von DFP bzw. PCMB waren signifikant ($p < 0,01$).

4. Hitzeempfindlichkeit der Aminopeptidasen des Hämolysats:

Zur quantitativen Bestimmung und Charakterisierung der Aminopeptidasen wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur gemessen.

a) Thermostabilität:

Zur Bestimmung der Thermostabilität wurde das Hämolysat 1, 2, 3 und 5 h vor Substratzugabe vorinkubiert. Dabei zeigte sich bei nahezu unveränderter Aktivität nach einstündiger Inkubationsdauer von $94,3 \pm 10,8 \%$ ($n = 9$) nach 2 h ein Aktivitätsabfall des Enzyms bis auf $82,8 \pm 17,1 \%$ ($n = 9$), nach 3 h bis auf $58,1 \pm 5,8 \%$ ($n = 9$) und nach 5 h bis auf $13,9 \pm 7,6 \%$ ($n = 9$) des Ausgangswertes. Außerdem wurde das Hämolysat 1 h bei steigenden Temperaturen von 30°C bis 80°C vor Substratzugabe vorinkubiert. Es ergab sich ein signifikanter Aktivitätsverlust bei Temperatursteigerung. Bei 50°C betrug die Aktivität nur noch $55,38 \pm 5,54 \%$ ($n = 5$), bei 55°C $47,60 \pm 5,32 \%$ ($n = 5$), bei 60°C $42,75 \pm 4,06 \%$ ($n = 5$), bei 70°C $38,86 \pm 9,09 \%$ und bei 80°C $17,64 \pm 3,45 \%$. **(Abb.3)**

b) Temperaturoptimum:

Zur Feststellung des Temperaturoptimums wurde bei steigenden Temperaturen inkubiert. Das Temperaturoptimum lag bei 47°C (Abb.2).

Diskussion

Durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung, pH-Variation und die unterschiedliche Beeinflußbarkeit durch Effektoren ließen sich verschiedene Aminopeptidasen im Hämolytat menschlicher Erythrozyten nachweisen. Da bei der Präparation des Hämolytats nach der Methode von Hennessey et al. (11) ca. 10 % der Aminopeptidaseaktivität verloren geht, besteht die Möglichkeit, daß einige weitere Aminopeptidasen quantitativ durch nicht erfolgte oder irreversible Adsorption an DEAE-Cellulose dem Nachweis entzogen wurden. Behal et al. (15) konnten zeigen, daß Aminopeptidasen des menschlichen Erythrozyten von DEAE-Cellulose schwer zu eluieren sind. Außerdem ist anzunehmen, daß die durch Ammoniumsulfatfällung gewonnenen Unterfraktionen keine einheitlichen Enzyme darstellen, sondern aus mehreren Aminopeptidasekomponenten zusammengesetzt sind.

Der Nachweis verschiedener Aminopeptidasen im Hämolytat wurde schon durch säulenchromatographische Verfahren von Dahlheim et al. (16) an Schweineerythrozyten und von Behal et al. (15) an menschlichen Erythrozyten erbracht.

Die von anderen Autoren beschriebene vollständige Hemmung der "Erythrozyten-angiotensinase" im menschlichen Hämolytat (6,8) sowie im Hämolytat von Schweinen (16) bzw. von Ratten (17) durch Na_2EDTA in dem pH-Bereich zwischen 6,8 und 8,0 konnte im membranfreien Gesamthämolytat menschlicher Erythrozyten nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz dieser Ergebnisse bieten Befunde von Zwanzig et al. (18). Diese Autoren zeigten, daß nach fünftägiger Dialyse gegen Na_2EDTA die Aminopeptidaseaktivität bei pH 8,0 und 8,6 partiell gehemmt und durch Ca^{++} total reaktiviert wurde. Dagegen führte eine direkte Inkubation mit Na_2EDTA nach einer partiellen Hemmung zu keiner Reaktivierung durch Ca^{++} . Somit ist es von Bedeutung, daß verschiedene der oben erwähnten Autoren

die Inkubationsstudien teils mit (6, 17) teils ohne (16,8) vorherige Dialyse durchgeführt haben. Außerdem dürfte eine wesentliche Rolle spielen, ob und wie lange mit Na_2EDTA präinkubiert wurde. Die Befunde anderer Autoren sind daher mit o.a. Ergebnissen nicht ohne weiteres vergleichbar.

Es konnte gezeigt werden, daß mit fallender Wasserstoffionenkonzentration zwischen pH 5,0 und 8,0 die Aminopeptidaseaktivität des Gesamthämolysats bei Inkubation mit Na_2EDTA zunehmend gehemmt wurde. In Fraktion III konnte bei pH 8,0 nach Na_2EDTA -Zugabe eine totale Hemmung der Enzymaktivität und keine Reaktivierung durch Ca^{++} festgestellt werden. Bei pH 7,0 war das durch Na_2EDTA nicht hemmbare Enzym der gleichen Fraktion sogar durch Ca^{++} vollständig reaktivierbar. Eine durch Ca^{++} bedingte Hemmbarkeit von Aminopeptidasen konnten Nagatsu et al. (19) auch im menschlichen Plasma nachweisen. Darüber hinaus konnten Zwanzig et al. (18) zeigen, daß durch Na_2EDTA gehemmte Aminopeptidasen des menschlichen Plasmas bei pH 8,0 durch Ca^{++} nicht reaktiviert werden konnten. Im Hämolysat konnte mit 10^{-3} mol/l PCMB - einem Hemmstoff von Enzymen, die in ihrem aktiven Zentrum SH-Gruppen tragen - sog. sulfhydrylabhängige Aminopeptidasen nachweisen. Auch Behal et al. (15) konnten mit PCMB in der Konzentration von 10^{-3} mol/l bei einer von ihnen als Rho_1 bezeichneten Aminopeptidase menschlicher Erythrozyten eine Inaktivierung um 85 % beobachten, wobei bei steigender PCMB-Konzentration die Enzymaktivität weiterhin abnahm. Ebenso konnten Itskowitz et al. (20) im menschlichen Erythrozyten durch eine 2×10^{-2} mol/l PCMB-Konzentration eine fast vollständige hemmbare Angiotensinase nachweisen. Matsunaga et al. (17) fanden schon bei einer PCMB-Konzentration von 10^{-3} mol/l eine komplette Hemmung der Aminopeptidase von Rattenerythrozyten.

Es konnte gezeigt werden, daß 10^{-3} mol/l DFP als Inhibitor chymotrypsinähnlicher Enzyme

die Inaktivierung von Asparaginy¹-Angiotensin II im Hämolysat menschlicher Erythrozyten in dem pH-Bereich von 6,5 bis 8,0 um etwa 45 % hemmt. Matsunaga et al. (17) sahen dagegen im Hämolysat von Rattenerthrozyten bei pH 7,5 keine Änderung der Enzymaktivität durch DFP in einer Konzentration von 5×10^{-3} mol/l. Eine von Kokubu et al. (21) aus Kaninchenerythrozyten isolierte Angiotensinase ließ sich wiederum durch 10^{-3} mol/l DFP bei pH 6,8 vollständig hemmen.

Die unterschiedlich starke Hemmbarkeit der Angiotensin-inaktivierenden Enzyme durch PCMB und DFP ist demnach offensichtlich abhängig von der Art der untersuchten Tierspezies und weiterhin von der großen Anzahl verschiedener Aminopeptidasen und deren unterschiedlicher Reinigung. Da sich nach einer zweistündigen Inkubationsdauer bei 37 ° C ein Aktivitätsabfall der Angiotensin-inaktivierenden Enzyme um ca. 20 %, nach 3 h schon um ca. 40 % ergab, verdient die Temperaturlabilität hinsichtlich der Präparations- und Anreicherungsverfahren besondere Bedeutung.

Zusammenfassung

In menschlichen Erythrozytenfraktionen (haemoglobinfreie Erythrozytenmembranen, membranfreies Haemolysat, durch DEAE-Cellulose von Haemoglobin befreite Enzym-Protein-Fraktion und durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung aus der Enzym-Protein-Fraktion gewonnene Unterfraktionen) wurde mit Hilfe eines NADH-abhängigen optischen Tests mit Asparaginsyl¹-Angiotensin-II-amid als Substrat die Aminopeptidaseaktivität untersucht.

1. Durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung wurden sechs Unterfraktionen aus der Enzym-Protein-Fraktion (EPF) gewonnen. Mit Hilfe von enzymkinetischen Untersuchungen bei drei verschiedenen pH-Werten (pH 5, 7, 8) und unter dem Einfluß von zwei verschiedenen Effektoren ($\text{Na}_2\text{-EDTA}/\text{Ca}^{++}$) gelang der Nachweis von sechs verschiedenen Enzymen, die sich signifikant unterscheiden.
2. Durch die Inhibitoren Diisopropylfluorophosphat (DFP) und p-Chloromercuribenzoat (PCMB) wurde bei verschiedenen pH-Werten eine signifikante Inaktivierung der Aminopeptidaseaktivität des membranfreien Hämolysats beobachtet.
3. Das Temperaturoptimum für die Aminopeptidaseaktivität des Hämolysats lag bei 47°C , obwohl schon bei 37°C nach einer Inkubation von 2 Stunden ein Aktivitätsverlust von 20 % auftrat.

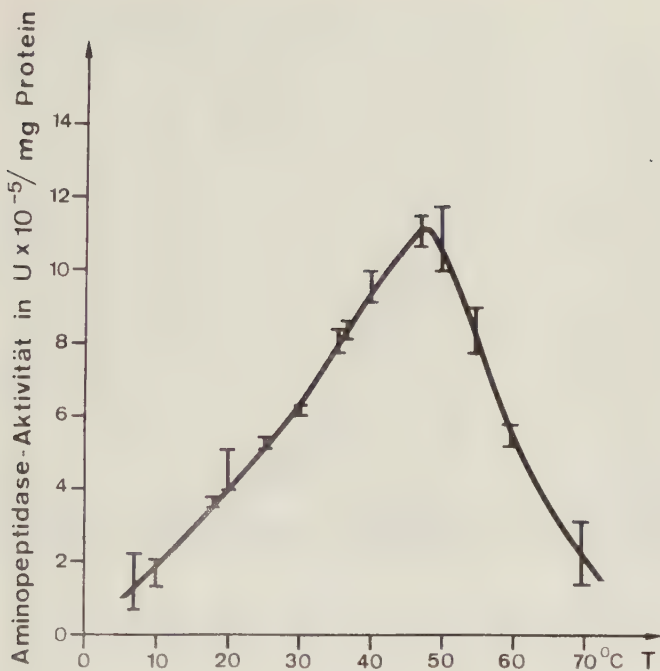


Abb. 2

Bestimmung des Temperaturoptimums der Amino-peptidase-aktivität des Hämolyats (I = Mittelwert $\pm$ Standardabweichung aus jeweils 5 Messungen; n= 5)

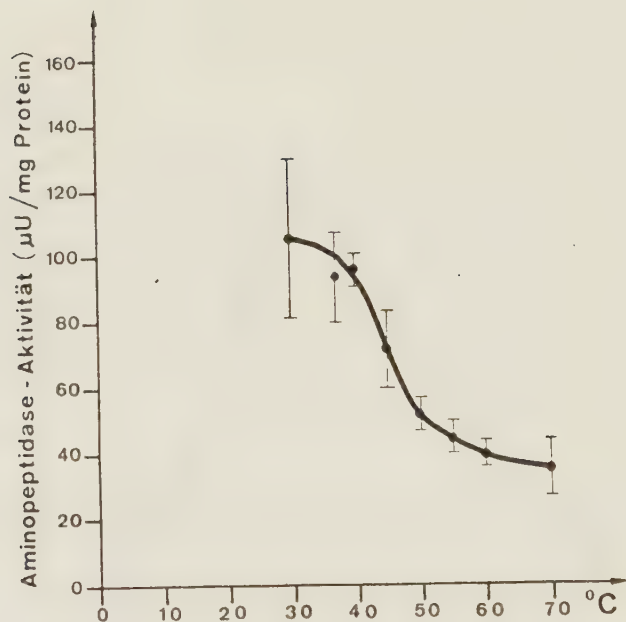


Abb. 3

Amino-peptidaseaktivität des Hämolyats in Abhängigkeit von der Temperatur. Das Hämolyat wurde 1 Std. lang bei steigenden Temperaturen vor Substratzugabe vorinkubiert.

Haemclysate	Membranen	EPF ⁺)	Mit (NH ₄) ₂ SO ₄ gefällte Unterfraktionen					
			I	II	III	IV	V	VI
			0,39	1,76	2,75	2,95	4,03	Überstand 4,03
8,49 ± 2,19 n = 5	11,20 ± 1,59 n = 5	8,68 ± 2,89 n = 5	6,88 ± 0,99 n = 5	6,54 ± 1,21 n = 5	5,87 ± 0,43 n = 5	6,10 ± 1,32 n = 5	6,10 ± 0,23 n = 5	6,57 ± 0,23 n = 5

Tab. I

Mittelwerte der Aminopeptidaseaktivität mit Standardabweichung in
U x 10⁻⁵/mg Protein bei pH 6,4

+) EPF = Enzym-Protein-Fraktion

Fraktionen	pH 5			pH 7			pH 8		
	kein Effektor	Na ₂ -EDTA 10 ⁻³ m	Na ₂ -EDTA 10 ⁻³ m + Ca ⁺⁺ 10 ⁻³ m	kein Effektor	Na ₂ -EDTA 10 ⁻³ m	Na ₂ -EDTA 10 ⁻³ m + Ca ⁺⁺ 10 ⁻³ m	kein Effektor	Na ₂ -EDTA 10 ⁻³ m	Na ₂ -EDTA 10 ⁻³ m + Ca ⁺⁺ 10 ⁻³ m
Haemolysat n = 5	6,60 ± 0,27 100 ± 4,0%	6,91 ± 1,66 104,6 ± 25,2%	7,82 ± 0,46 118,6 ± 7,0%	6,14 ± 0,70 100 ± 11,4%	4,90 ± 0,0 73,4 ± 0%	3,03 ± 0,73 49,3 ± 11,8%	10,14 ± 0,46 100 ± 4,5%	3,59 ± 0,28 35,4 ± 2,8%	4,00 ± 0,25 39,5 ± 2,5%
EPF ⁺⁾ n = 5	6,91 ± 0,46 100 ± 6,6%	6,72 ± 0,10 97,2 ± 1,5%	6,91 ± 0,46 100 ± 6,6%	13,51 ± 0,26 100 ± 1,9%	1,87 ± 0,20 13,8 ± 1,5%	3,30 ± 0,19 24,4 ± 1,4%	10,90 ± 0,96 100 ± 8,8%	2,94 ± 0,35 27,0 ± 3,2%	2,84 ± 0,11 26,1 ± 0,9%
Mit Ammoniumsulfat gefällte Fraktionen der EPF ⁺⁾ :									
0,39 m I n = 5	4,91 ± 0,53 100 ± 10,7%	2,84 ± 0,20 57,8 ± 4,1%	2,38 ± 0,08 48,5 ± 1,5%	5,83 ± 0,26 100 ± 4,4%	3,50 ± 0,25 60,1 ± 4,3%	3,90 ± 0,13 66,8 ± 2,1%	6,14 ± 0,70 100 ± 11,4%	1,58 ± 0,28 25,7 ± 4,5%	2,77 ± 1,29 45,1 ± 21,1%
1,76 m II n = 5	5,41 ± 0,26 100 ± 4,8%	3,01 ± 0,08 55,7 ± 1,4%	1,63 ± 0,08 30,0 ± 1,4%	4,65 ± 1,68 100 ± 36%	3,58 ± 0,21 76,9 ± 4,5%	3,15 ± 0,13 67,8 ± 2,7%	6,05 ± 0,80 100 ± 13,2%	1,06 ± 0,54 17,8 ± 8,9%	3,47 ± 1,02 57,4 ± 16,9%
2,35 m III n = 5	3,40 ± 0,70 100 ± 20,8%	3,04 ± 0,09 89,4 ± 2,7%	2,89 ± 0,09 84,9 ± 2,7%	3,48 ± 0,70 100 ± 20%	3,28 ± 0,51 94,4 ± 14,5%	0 0%	3,87 ± 0,54 100 ± 13,9%	0 0%	0 0%
2,97 m IV n = 5	3,87 ± 0,71 100 ± 18,3%	1,95 ± 0,59 50,4 ± 15,2%	2,86 ± 0,08 73,9 ± 1,9%	5,60 ± 0,44 100 ± 7,8%	3,45 ± 0,29 61,6 ± 5,1%	3,79 ± 0,50 67,9 ± 8,9%	4,49 ± 0,96 100 ± 21,4%	2,07 ± 0,39 46,2 ± 8,6%	4,66 ± 0,38 103,8 ± 8,4%
4,03 m V n = 5	4,18 ± 0,93 100 ± 22,1%	2,89 ± 0,09 69,0 ± 2,2%	2,86 ± 0,23 68,4 ± 5,4%	4,51 ± 0,72 100 ± 15,9%	2,61 ± 0,19 57,9 ± 4,3%	4,40 ± 0,71 97,8 ± 1,6%	3,09 ± 0,53 100 ± 17,2%	1,79 ± 0,09 57,8 ± 2,9%	3,17 ± 0,54 102,5 ± 17,4%
4,03 m VI Überstand n = 5	6,37 ± 1,09 100 ± 17,2%	2,01 ± 0,31 31,6 ± 4,9%	2,95 ± 0,31 46,2 ± 4,8%	3,71 ± 0,80 100 ± 21,5%	2,39 ± 0,24 64,3 ± 6,3%	0 0%	4,34 ± 0,97 100 ± 22,3%	1,57 ± 0,26 36,3 ± 6,0%	4,67 ± 0,38 107,8 ± 8,7%

+) EPF = Enzym-Protein-Fraktion

•• p < 0,01
• p < 0,05

Tab. II

Absolutwerte und Prozentwerte mit Standardabweichung der Amino-peptidase-aktivitäten, der membranfreien Erythrozytenfraktionen vor und nach Zusatz von Na₂EDTA und Ca⁺⁺ bei pH 5, 7 und 8

Die Enzymaktivitäten sind in U x 10⁻⁵ mg Protein mit Standardabweichung angegeben. Die Aktivitäten ohne Effektoren wurden als 100 Prozent gesetzt und die durch die Effektoren bedingten Änderungen prozentual auf die Ausgangsaktivität bezogen. Die Standardabweichungen der Prozentangaben wurden aus den Absolutwerten der Ausgangsaktivität errechnet.

Effektoren	pH 5	pH 6,5	pH 7	pH 8
DPP 10^{-3} m	n = 5 68,7 $\pm$ 1,5 % (p < 0,01)	n = 5 51,3 $\pm$ 2,4 % (p < 0,01)	n = 5 59,6 $\pm$ 5,8 % (p < 0,01)	n = 5 55,2 $\pm$ 3,8 % (p < 0,01)
PCMB 10^{-3} m		n = 5 33,9 $\pm$ 0,8 % (p < 0,01)	n = 5 18 $\pm$ 1,1 % (p < 0,01)	n = 5 18,1 $\pm$ 2,7 % (p < 0,01)
keine	100 %	100 %	100 %	100 %

Tab. III

Aminopeptidaseaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität nach Zugabe der Effektoren. (Da PCMB unterhalb von pH 6,5 präzipitiert, waren bei pH 5,0 keine Messungen möglich)

Literaturverzeichnis

1. CHINN, R.H., G. DÜSTERDIECK:
The Response of Blood Pressure to Infusion of Angiotensin II:
Relation to Plasma Concentrations of Renin and Angiotensin II.
Clin. Sci. 42, (1972), pp 489
2. SILAH, J.G., C.G.STRONG, W. NOWACZYNSKY, J. GENEST:
The Angiotensin Infusion Test and Peripheral Venous Renin Activity.
Canad. Med. Ass. J. 96, (1967), pp 1397
3. WEIDMANN, P., P. ENDRA, W. SIEGENTHALER:
Plasma Renin Activity and Angiotensin Pressor Dose in Hypertension.
Correlations and Diagnostic Implications.
Brit. Med. J. III, (1968), pp 154
4. JOHNSTON, C.I., A.D. JOSE:
Reduced Vascular Response to Angiotensin II in Secondary Hyperaldosteronism.
J. Clin. Invest. 42, (1963), pp 1411
5. HICKLER, R.B., D.P. LAULER, G.W. THORN:
Plasmaangiotensinase - Activity in Patients with Hypertension and Edema.
J. Clin. Invest. 42, (1963), pp 635
6. KHAIRALLA, P.A., F.M. BUMPUS, J.H. PAGE, R.R. SMEBY:
Angiotensinase with a High Degree of Specificity in Plasma and Red
Blood Cells.
Science 140, (1963), pp 672
7. KLAUS, D., H. KAFFARNIK, H. PFEIL:
Untersuchungen über die Serum-Angiotensinase, II. Mitteilung.
Klin. Wschr. 41, (1963), pp 379
8. KCKUBU, T., E. UEDA, S. FUJIMOTO, K. HIWADA, H. SANGA,
Y. YAMAMURA:
Angiotensinase in Red Cells.
Clin. Chim. Acta 13, (1966), pp 13
9. PAGE, I.H., F.M. BUMPUS:
Angiotensin.
Physiol. Rev. 41, (1961), pp 331
10. REGOLI, D., W.K. PARK:
The Pressor and Myotropic Effects and Antagonistic Properties of Several
Analogues of Angiotensin II.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 50, (1972), pp 99

11. HENNESSEY, M.A., A.M. WALTERSDORPH, F.M. HUNNEKENS,
B.W. CABRIC:
Erythrocyte Metabolism.
VI. Separation of Erythrocyte Enzymes from Hemoglobin.
J. Clin. Invest. 41, (1962), pp 1257
12. CELKERS, W., I.U. v. GOLDBACKER:
Bestimmung der Angiotensinase- (Aminopeptidase)-Aktivität im Serum
mit einem DPN H-abhängigen optischen Test.
Klin. Wschr. 45, (1967), pp 649
13. COSTLE, B.:
Statistics in Research.
The Iowa State University Press, Second Edition, (1964), pp 235
14. BROWNLIE, K.A.:
Statistical Theory and Methodology in Science and Engineering.
John Wiley and Sons, Inc. New York, (1967), pp 504
15. BEHAL, F.J., R.D. HAMILTON, C.B. KANAVAGE, E.C. KELLY:
Studies on Aminopeptidase in Human Blood.
Arch. Biochim. et Biophys. 100, (1963), pp 308
16. DAHLHEIM, H., K. PETSCHAUER, K. THURAU:
Anreicherung und Charakterisierung der Erythrozytenangiotensinase.
Pflügers Arch. ge. Physiol. 305, (1969), pp 105
17. MATSUNAGA, M., G.M.C. MASSON:
Hepatic and Renal Angiotensinases.
Experientia 26, (1970), pp 1297
18. ZWANZIG, M., W. OELKERS:
Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit, die Hemmbarkeit und
Reaktivierbarkeit von Angiotensin II amid-spaltenden Enzymen des
menschlichen Plasmas.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 7, (1969), pp 253
19. NAGATSU, J., L. GILLESPIE, J.E. FOLK, G.G. GLENNER:
Serum Aminopeptidase "Angiotensinase" and Hypertension - I.
Biochem. Pharmacol. 14, (1965), pp 721
20. ITSKOWITZ, H.D., L.D. MILLER:
Differential Studies of Angiotensinase Activity from Several Tissue Sources.
Am. J. Med. Sci. 254, (1969), pp 659
21. KOKUBU, T., H. AKKUTSU, S. FUJIMOTO, E. UEDA, K. HIWADA,
Y. YAMAMURA:
Purification and Properties of Endopeptidase from Rabbit Red Cells and
Process of Degeneration on Angiotensin.
Biochim. et Biophys. Acta 191, (1969), pp 668

Lebenslauf

Ich wurde als Sohn des Offiziers Ismet Kantarcioglu am 2.6.1945 in Ankara geboren. Absolvierte das Gymnasium im Sommer 1964 in Istanbul. Ich kam im Dezember 1964 nach Deutschland, besuchte zwei Semester das Studienkolleg an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz und legte die Reifeprüfung zur Feststellung der Hochschulreife ab. Im Jahre 1967 begann ich mit dem Medizinstudium. In Mainz studierte ich 11 Semester Medizin. Die ärztliche Vorprüfung legte ich am 8.10.1969 in Mainz ab. Am 1. Dezember 1972 bestand ich die ärztliche Prüfung in Mainz.

Vom 1. Januar 1973 bis 1. Februar 1974 leistete ich die einjährige Medizinalassistentenzeit jeweils 4 Monate in der chirurgischen Abteilung des Marienkrankenhauses in Düsseldorf/Kaiserswerth, im Franken-Sanatorium in Bad Neustadt an der Saale und in der chirurgischen Abteilung des Clemens-August-Krankenhauses in Bitburg ab.

Seit dem 1. Februar 1974 bin ich als Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung des Clemens-August-Krankenhauses in Bitburg angestellt und befinde mich in der chirurgischen Weiterbildung.

